

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

Tuberculose multirresistente: A experiência da Unidade de Tuberculose do Hospital de Pulido Valente

Multidrug-resistant tuberculosis: The impact and management in a Lisbon Tuberculosis Unit

CARLOS GOMES*

Serviço de Infecção Respiratória (Director: Dr. Jaime Pina)
Unidade de Tuberculose. Hospital de Pulido Valente

RESUMO

Procedemos à análise retrospectiva da casuística referente ao primeiro ano de actividade da Unidade de Tuberculose do Hospital de Pulido Valente (Abril de 1999 a Abril de 2000), correspondente a 175 internamentos.

Registámos 20 casos de Tuberculose Multirresistente (TB-MR) (11,4%), 10 com Tuberculose Mono-

ABSTRACT

Objective – To compare a group of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis (MDR-TB) and patients with various patterns of resistance (including drug-susceptible tuberculosis), and to determine whether there had been adequate management practices associated with multidrug resistance.

Design – Descriptive study.

* Assistente Hospitalar de Pneumologia com o Grau de Consultor, do Hospital de Pulido Valente

Recebido para publicação: 00.09.06

Aceite para publicação: 00.10.24

resistente (a 1 antibacilar de 1ª linha) (5,7%), 3 com Tuberculose Poliresistente (a 2 ou mais antibacilares de 1ª linha, que não Isoniazida e Rifampicina) (1,7%) e 142 doentes com Tuberculose sensível a todos os antibacilares de 1ª linha (81,2%). Comparámos estes quatro grupos com vista à individualização de diferenças significativas relativamente aos seguintes factores comumente associados ao fenómeno da multirresistência: características demográficas, imigração, comportamentos de risco, carga bacilar e esquemas antibacilares prévios (constituição, número e duração).

O número médio de tratamentos prévios foi o único factor associado à TB-MR (2,9), cuja diferença se revelou estatisticamente significativa relativamente aos outros grupos ($p < 0,001$).

No grupo da TB-MR (20 doentes) analisámos os problemas da transmissão nosocomial e da efectividade terapêutica, face aos resultados do antibiograma. Em 11 casos de TB-MR (55%) verificámos que os doentes não estiveram em regime de isolamento. Em 8 casos de TB-MR (40%) a terapêutica antibacilar prescrita ou não teve qualquer eficácia ou redundou em monoterapia.

Concluimos que o número de tratamentos prévios constituiu o principal factor predictivo na TB-MR e que o isolamento sistemático destes doentes bem como o recurso a técnicas de amplificação genética devem ser mandatórios, face à necessidade imperiosa de um diagnóstico e tratamento precoces das resistências e ao risco aumentado de transmissão de TB-MR.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (6):587-594

Palavras-chave: Tuberculose multirresistente; Tuberculose pulmonar; Transmissão nosocomial.

Setting – Tuberculosis Unit (Pulido Valente Hospital), Lisbon, Portugal.

Method – The records of all admitted patients between April 1999 and April 2000 were reviewed to ascertain whether there had been significant differences regarding demographic factors, immigration, HIV status, sputum smear results and prior treatment history and whether the decisions related to therapeutic prescriptions and isolation care facilities were technically adequate.

Results – Among 175 study patients, 20 MDR-TB were observed (11,4%). The number of prior treatments was the only factor with a statistical significance associated with MDR-TB (average: 2,9 – $p < 0,001$). In the MDR-TB group, eleven patients didn't benefit of isolation care facilities (55%) and 8 patients (40%) were treated with a regimen with less than 2 active antimycobacterial drugs.

Conclusions – Inappropriate or noncompliant prior treatment were associated with MDR-TB. Tighter control on the provisions of isolation for tuberculosis patients and committing additional laboratory resources (amplification genotypic methods) to standard institutional care are vital in limiting the transmission and development of acquired drug resistance.

REV PORT PNEUMOL 2000; VI (6): 587-594

Key-words: Multidrug-resistant tuberculosis; Pulmonary tuberculosis; Nosocomial transmission.

INTRODUÇÃO

A resistência aos antibacilares nada mais é do que a amplificação (induzida pelo homem) do fenómeno natural das mutações espontâneas a nível dos genes do *M. tuberculosis* (1). A tuberculose multirresistente (TB-MR) (resistência a pelo menos à Isoniazida e Rifampicina), a forma mais grave de resistência aos antibacilares, desenvolve-se quer como consequência

de tratamento inadequado (resistência adquirida ou secundária) quer por infecção por organismos resistentes (resistência primária) (2). Genericamente, a resistência primária reflecte o mau desempenho dos programas de luta antituberculosa no passado, sendo pouco sensível às modificações e ajustamentos na actualidade, enquanto que a resistência adquirida traduz uma deficiente abordagem terapêutica no presente (3).

A estratégia para o controle da multirresistência baseia-se, segundo a OMS, num Programa de Vigilância Global que requer informação quantitativa e qualitativa não só sobre os indicadores epidemiológicos, mas também sobre todos os processos envolvidos na prescrição, fornecimento e toma das drogas antibacilares (4). A prioridade deve ir para a prevenção de novos casos de resistência adquirida, pelo que devem ser implementadas todas as medidas destinadas a assegurar o tratamento eficaz dos doentes, como sejam normas terapêuticas correctas, formação e treino do pessoal de saúde, fornecimento adequado dos antibacilares e adopção de estímulos e apoios com vista à melhoria da adesão à terapêutica (5). Por outro lado, há que consolidar uma estratégia de prevenção da transmissão que deve incluir o diagnóstico precoce dos casos suspeitos, o rastreio activo nos grupos de alto risco, o tratamento adequado de todos os casos confirmados e medidas de controle da infecção em hospitais e outros ambientes de elevado risco de transmissão (6).

Após o primeiro ano de actividade da Unidade de Tuberculose do Hospital de Pulido Valente procedemos à análise retrospectiva da casuística com o objectivo de, por um lado, avaliar os parâmetros clínico-epidemiológicos associados ao fenómeno da multirresistência e, por outro, analisar a problemática da transmissão nosocomial e da efectividade terapêutica, face aos resultados do antibiograma.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos todos os casos com o diagnóstico da saída de tuberculose pulmonar, bacteriológicamente confirmada, cujo internamento na Unidade de Tuberculose tenha decorrido no período de Abril de 1999 a Abril de 2000.

Os doentes foram divididos em 4 grupos, consoante os vários tipos de definição de resistência, propostos pela OMS (1,7): 1) Tuberculose sensível a todos os antibacilares de 1ª linha; 2) Multirresistência (resistência simultânea à Isoniazida e Rifampicina, a que

se podem associar resistências a outros fármacos antibacilares), 3) Monorresistência (resistente apenas a um dos antibacilares *major*) e 4) Polirresistência (resistência a mais do que um dos antibacilares *major*, que não Isoniazida e Rifampicina em simultâneo).

De acordo com a mesma organização, considerámos um caso de Resistência Primária (ou inicial) quando a estirpe era proveniente de doente primotratado e que nunca tenha tomado antibacilares (ou que eventualmente o tenha feito durante um período inferior a 1 mês), atribuindo a designação de Resistência Adquirida aos doentes com bacilos resistentes, previamente tratados durante, pelo menos, 1 mês.

Comparámos estes quatro grupos com vista à individualização de diferenças significativas relativamente às seguintes variáveis frequentemente associadas ao fenómeno da resistência: idade, sexo, raça, imigração, comportamento de risco, carga bacilar no exame directo à entrada e tratamento(s) antibacilar(es) prévio(s) (número, duração e esquema adoptado).

Relativamente ao grupo da TB-MR comparámos, por um lado, os doentes em regime de isolamento relativamente àqueles que estiveram em enfermaria e, por outro, o número de antibacilares com actividade efectiva, face ao conhecimento dos resultados do antibiograma "a posteriori", a fim de evidenciar as questões da transmissão nosocomial e da eficácia terapêutica.

Os dados foram analisados usando o *software* SPSS 8.0® (SPSS Inc.1997). O teste de Anova foi utilizado na comparação das variáveis de tipo contínuo e o método Log-linear nas variáveis nominais. A regressão logística foi empregue na análise multivariada para a identificação dos factores associados à presença de TB-MR.

RESULTADOS

Foram analisados 175 internamentos, correspondentes ao período em análise. Contabilizámos 20 casos de Tuberculose Multirresistente (TB-MR) (11,4%), 10 com Tuberculose Monorresistente (5,7%), 3 com

Tuberculose Polirresistente (1,7%) e 142 com Tuberculose sensível a todos os antibacilares de 1ª linha (81,2%), cujas características principais se discriminam no Quadro I.

Os doentes apresentavam uma média etária de 40,7 anos, pertencendo maioritariamente ao sexo masculino (141-80,6%) e à raça caucasiana (154-88,0%), constituindo os imigrantes uma pequena fracção (17-9,7%). Por outro lado, constatámos uma elevada prevalência da coinfeção pelo VIH (75-42,9%) e da toxicod dependência (67-38,3%), cuja distribuição pelos diferentes grupos não revelou diferenças significativas.

No que concerne à terapêutica antibacilar prévia, verificámos que 68 doentes (38,9%) tinham sido submetidos a esquemas antibacilares diversos (Quadro II), cujo número e duração do tratamento atingiram valores muito díspares assumindo, no entanto, uma diferença estatisticamente significativa no grupo TB-MR (média de 2,9 tratamentos prévios - $<0,001$) (Quadro III).

Na análise multivariada (regressão logística), com o objectivo de determinar o valor predictivo dos factores associados ao grupo TB-MR, utilizámos as seguintes variáveis independentes: idade, sexo, raça, imigração, serologia VIH, toxicod dependência, carga

QUADRO I
Caracterização clínico-epidemiológica dos quatro grupos de resistência

Variáveis	TB-MR (n=20) (%)	Mono Resistência (n=10) (%)	Poli Resistência (n=3) (%)	Sensível (n=142) (%)	Valor p
<i>Variáveis categoriais</i>					
Sexo masculino	16 (11,4)	7 (5,0)	2 (1,3)	116 (82,3)	0,75
Raça caucasiana	18 (11,7)	7 (4,5)	3 (1,9)	126 (81,8)	0,31
Imigrante	1 (5,9)	3 (17,6)	0	13 (76,5)	0,40
Toxicod dependente	4 (6,0)	3 (4,5)	1 (1,5)	59 (88,0)	0,27
VIH(+)	6 (8,0)	2 (2,7)	1 (1,3)	66 (88,0)	0,23
Terapêutica prévia	14 (20,6)	3 (4,4)	1 (1,5)	50 (73,5)	0,09
<i>Variáveis contínuas (média)</i>					
Idade	38,9	35,8	38,0	41,4	0,12
Nº tratamentos prévios	2,9	1,0	1,0	1,3	$<0,001$
Tratamentos prévios (duração em meses)	5,9	1,3	1,9	4,9	0,11
Carga bacilar	2,8	2,4	2,3	2,2	0,49

QUADRO II
Esquema antibacilar prévio

	TB-MR (n = 20) (%)	Mono Resistência (n=10) (%)	Poli Resistência (n=3) (%)	Sensível (n=142) (%)
HRZE	9 (19,1)	2 (4,3)	0	36 (76,6)
HRZES	4 (100)	0	0	0
HR + 1 antibacilar 1ª linha	0	0	0	3 (100)
H + 2 antibacilares 1ª linha	1 (33,3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)
Desconhecido	0	1 (9,1)	0	10 (90,9)

QUADRO III
Número e duração de tratamentos antibacilares prévios

	TB-MR	Mono Resistência	Poli Resistência	Sensível	Valor p
Tratamentos prévios (média)	2,9	1,0	1,0	1,3	< 0,001
Duração (meses)	5,9	1,3	4,2	4,9	0,11

bacilar e número de tratamentos prévios. O modelo empregue excluiu todas as variáveis com exceção do número de tratamentos prévios (coeficiente de correlação parcial de 0,59), que se assumiu como a única variável independente associada à TB-MR ($p < 0,001$).

Analisando em pormenor o grupo TB-MR (20 doentes), através da confrontação dos casos de multirresistência primária relativamente aqueles de multirresistência adquirida, observámos também uma predominância do sexo masculino (80%), da raça caucasiana (90%) e da nacionalidade portuguesa (95%), situando-se a prevalência da infecção VIH a nível dos 30%; a cavitação constituiu a apresentação radiológica predominante (45%) (Quadro IV).

Relativamente ao perfil de resistências, e como seria de esperar, o sub-grupo da TB-MR Adquirida caracterizava-se por apresentar um maior número de fármacos resistentes (de 1ª e 2ª linhas) (Quadro V).

No entanto, os resultados do antibiograma remetem, desde logo, para a problemática da transmissão nosocomial uma vez que 13 doentes do grupo TB-MR (55%) não estiveram internados em regime de isolamento (Quadro VI).

De igual modo, a ausência do conhecimento do perfil de resistências, em tempo real, comprometeu indubitavelmente a eficácia terapêutica dos esquemas administrados em internamento, dado que neste grupo apenas 9 doentes (45%) beneficiaram de um esquema

QUADRO IV
Padrões radiológicos na TB-MR

	TB-MR Primária (n=6) (%)	TB-MR Adquirida (n=14) (%)
Cavitação	3 (33,3)	6 (66,7)
Alveolar	0	4 (100)
Nodular	1 (25)	3 (75)
Reticular	2 (66,7)	1 (33,3)

QUADRO V
Antibiograma na TB-MR

	TB-MR Primária (n=6)	TB-MR Adquirida (n=14)
HR	1	0
HR + 1 antibacilar 1ª linha	1	0
HR + 2 antibacilares 1ª linha	2	4
HRZES	1	2
HR + 2 antibacilares 1ª linha + antibacilares de 2ª linha	1	4
HRZES + antibacilares de 2ª linha	0	4

QUADRO VI
Local de internamento e antibiograma (TB-MR)

	Enfermaria (n=11)	Isolamento (n=9)
HR	0	1
HR + 1 antibacilar 1ª linha	1	0
HR + 2 antibacilares 1ª linha	4	2
HRZES	3	0
HR + 2 antibacilares 1ª linha + antibacilares de 2ª linha	3	2
HRZES + antibacilares de 2ª linha	0	4

com 3 ou mais antibacilares eficazes; por outro lado, em 8 casos (40%) os antibacilares prescritos ou não possuíam qualquer efectividade bacteriológica ou resultaram pura e simplesmente em monoterapia (Quadro VII).

No entanto, a investigação clínica continua a ser importante no delinear da estratégia de abordagem aos doentes portadores de provável tuberculose multirresistente, face ao tempo que medeia entre início da terapêutica e o conhecimento do antibiograma efectua-

QUADRO VII
Efectividade terapêutica (TB-MR)

	TB-MR Primária (n=6)	TB-MR Adquirida (n=14)
Ausência	2	2
1 antibacilar activo	1	3
2 antibacilares activos	1	2
3 antibacilares activos	1	3
4 antibacilares activos	1	4

DISCUSSÃO

Na nossa amostra, os 20 casos de TB-MR corresponderam a 6 doentes com TB-MR Primária e 14 com TB-MR Secundária o que, relativamente à totalidade dos doentes (175), atinge a uma prevalência de 3,4% e 8,0% respectivamente. Esta distribuição poderá reflectir alguns vizes relacionados com os critérios de internamento (11), sobretudo se comparadas com as taxas apresentadas no estudo de Antunes e col. (1,8% e 20,9%) que, ao abranger um total de 1105 doentes, reunidos durante 3 anos em 46 centros distribuídos por todo o território continental constitui, indubitavelmente, um retrato mais fidedigno da realidade nacional (12).

do pelos métodos clássicos. De facto, apesar do desenvolvimento das chamadas novas técnicas destinadas à avaliação do perfil de resistências aos antibacilares, nomeadamente PCR-SSCP e *reporter mycobacteriophage* (8), o elevado custo e o nível de tecnologia requerido tem impedido o seu uso rotineiro na prática assistencial. Assim, uma elevada suspeita clínica continua a ser fundamental, sublinhada por múltiplos estudos que individualizaram factores/variáveis comuns associados à resistência (9,10): 1) história de tratamento anti-bacilar anterior; 2) contacto com caso índice de resistência; 3) doente oriundo de país/região com elevada prevalência de resistência; 4) doente que não responde ao tratamento ou cujas baciloscopias se tornam novamente positivas após conversão inicial do

exame cultural.

Deste modo, comparámos variáveis de cariz clínico-epidemiológico relevante, de modo a destacar um padrão característico do grupo TB-MR relativamente aos restantes três grupos de resistência. De modo análogo a outros autores (13,14), individualizámos a não aderência à terapêutica antibacilar, sob a forma de múltiplos tratamentos irregulares e incompletos, como o factor principal na génese da multirresistência.

Pelo contrário, e de modo diverso ao referido frequentemente na literatura (10,15), o estatuto de imigrante não se associou significativamente a este fenómeno, o que poderá ser explicado pela sua reduzida proporção na nossa amostra.

Por outro lado, apesar da relação entre o aumento na incidência de tuberculose multirresistente e infecção VIH, não está provado que esta, por si só, constitua um factor de risco para o desenvolvimento de resistências, podendo reflectir apenas uma exposição selectiva em áreas com níveis crescentes de TB-MR (16). Os resultados do nosso estudo apontam no mesmo sentido pois, apesar da elevada seroprevalência para o VIH (30%), e independentemente da carga bacilar em exame directo, também não ficou demonstrada uma relação com a TB-MR. Assim sendo, a ocorrência de frequentes surtos de TB-MR em doentes coinfectados pelo VIH, deverá ser explicada pelo risco muito aumentado de progressão de infecção recente para doença (cerca de 10% ao ano) e pela constatação de reinfecções exógenas cada vez mais frequentes que, aliadas aos atrasos no reconhecimento das resistências levam a um aumento da resistência, sobretudo adquirida, pelo mecanismo de monoterapia indirecta (16).

A partir dos anos noventa, a tipagem molecular de estirpes de *M. tuberculosis*-genotipagem ou "DNA fingerprinting / RFLP"- deu um decisivo impulso aos conhecimentos sobre a epidemiologia molecular da tuberculose. Assim, a análise das diferentes bandas de DNA permite agrupar estirpes com padrões idênticos de RFLP evidenciando grupos epidemiologicamente relacionados (8), contribuindo decisivamente para a

identificação de surtos de TB-MR, nomeadamente de aquisição nosocomial.

Efectivamente, diversos estudos em áreas urbanas dos Estados Unidos da América demonstraram que a transmissão recente é responsável por aproximadamente 40% dos casos de tuberculose, calculando-se que cerca 17% dos casos podem resultar da transmissão a partir de doentes com baciloscopias negativas em exame directo e positivas em cultura (17).

Estes dados vêm sublinhar, por um lado, a enorme preocupação com que encaramos as consequências que podem advir do facto de 55% dos doentes com TB-MR não terem sido internados em regime de isolamento e, por outro, a necessidade cada vez mais premente da implementação da epidemiologia molecular como forma de determinar a susceptibilidade dos grupos vulneráveis aos surtos de tuberculose nosocomial, nomeadamente os doentes VIH positivos (18). Pelo facto da análise genotípica dos marcadores de resistência requerer apenas um crescimento cultural mínimo, ou mesmo dele não necessitar, serão de antever enormes vantagens sobre os antibiogramas convencionais, como sejam um tempo de resposta muito mais célere (dias em vez de semanas ou meses), possibilidade de automatização e redução do risco biológico a nível laboratorial (8).

Se bem que não nos seja possível, por ora, estender o regime de isolamento sistemático a todos os doentes com tuberculose (indubitavelmente a medida mais correcta na prevenção da transmissão nosocomial), não pudemos deixar de sublinhar que a demora nos resultados do antibiograma contribui significativamente para a potenciação deste problema, ao mesmo tempo que compromete a eficácia terapêutica dos esquemas prescritos.

Assim, a verificação de que no grupo TB-MR apenas 45% dos doentes beneficiaram de um esquema com 3 ou mais antibacilares eficazes e que em 40% dos casos os antibacilares prescritos ou não possuíam qualquer efectividade bacteriológica ou resultaram em monoterapia, representa a ilustração prática de como as estruturas consagradas ao tratamento destes doentes podem contribuir para o agravamento do fenóme-

no da (multi)resistência adquirida. Deste modo, e tal como Iseman (19), reputamos da maior importância a adopção de medidas correctivas de carácter profundo e urgente, que devem passar pela formação intensiva dos profissionais de saúde, pelo rigoroso controle das instalações destinadas ao tratamento destes doentes e pela atribuição de mais recursos aos programas de controle da tuberculose.

CONCLUSÕES

Concluimos que o número de tratamentos prévios constituiu o principal factor predictivo na TB-MR e que o isolamento sistemático destes doentes bem como o recurso a técnicas de amplificação genética devem ser mandatórios, face à necessidade imperiosa de um diagnóstico e tratamento precoces das resistências e ao risco aumentado de transmissão de TB-MR.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug-Resistance Surveillance 1994-1997: Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World 1997.
2. CHAULET P, RAVIGLIONE M, BUSTREO F. Epidemiology, control and treatment of Multidrug-resistant Tuberculosis. *Drugs* 1996; 52 Suppl 2: 103-108.
3. COHN DL, BUSTREO F, RAVIGLIONE M. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *CID* 1997; 24 (Suppl 1): S121-S130.
4. GLOBAL TUBERCULOSIS PROGRAMME WORLD HEALTH ORGANIZATION, GENEVA. Guidelines for the Management of Drug-Resistant Tuberculosis. 1997; WHO/TB/96.210.
5. GLOBAL TUBERCULOSIS PROGRAMME WORLD HEALTH ORGANIZATION, GENEVA. Treatment of Tuberculosis - Guidelines for National Programmes. 1997; WHO/TB/97.220.
6. MAHMOUDI A, ISEMAN MD. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. *JAMA* 1993; 270: 65-68.
7. TUBERCULOSIS PROGRAMME WORLD HEALTH ORGANIZATION, GENEVA, AND INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE, PARIS. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/94. 178.
8. HEIFETS LB, CANGELOSI GA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3 (7): 564-581.
9. KRITSKI AL et al. Retreatment Tuberculosis Cases - Factors associated with drug resistance and adverse outcomes. *Chest* 1997; 111: 1162-1167.
10. LAMBREGTS VW. Drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir Mon* 1997; 4 (2): 298-326.
11. DIRECÇÃO GERAL DA SAÚDE. Programa Nacional de Controlo da Tuberculose 1999; pag. 22-26.
12. ANTUNES ML, ALEIXO-DIAS J, ANTUNES AF, PEREIRA MF, RAYMUNDO E, RODRIGUES MF. Anti-tuberculosis drug resistance in Portugal. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (2): 223-231.
13. MANANGAN LP, JARVIS WR. Preventing Multidrug-resistant Tuberculosis and errors in tuberculosis treatment around the globe. *Chest*. 2000; 117 (3): 620-623.
14. ISEMAN MD. Management of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Chemotherapy* 1999; 45 (suppl 2): 3-11.
15. FLAMENT-SAILLOUR M, ROBERT J, JARLIER V, GROSSET J. Outcome of Multidrug-Resistant Tuberculosis in France. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 587-593.
16. SPELLMAN CW, MATTY KJ, WEIS SE. A survey of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and its relationship to HIV infection. *AIDS* 1998; 12 (2): 191-195.
17. JASMER RM, HAHN JA, SMALL PM et al. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med* 1999; 130: 971-978.
18. LAUZARDO M, ASHKIN D. Phthisiology at the dawn of the new century - A review of tuberculosis and the prospects for its elimination. *Chest* 2000; 117 (2): 1455-1473.
19. MAHMOUDI A, ISEMAN MD. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. *JAMA* 1993; 270 (1): 65-68.